

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-131569

⑬ Int.Cl.⁵
C 12 M 1/00

識別記号
B

序内整理番号
8717-4B
8717-4B
8515-4B

⑭公開 平成2年(1990)5月21日
C 12 N 15/00
5/00

B
B※

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全8頁)

⑮発明の名称 マイクロチャンバプレートおよび粒子判別方法ならびに粒子処理装置
置および細胞処理装置

⑯特願 昭63-283601
⑰出願 昭63(1988)11月11日

⑱発明者 河村 喜雄 東京都国分寺市東恋ヶ窓1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲発明者 田中 伸司 東京都国分寺市東恋ヶ窓1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳発明者 佐藤 一雄 東京都国分寺市東恋ヶ窓1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑出願人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒代理人 弁理士 小川 勝男 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

マイクロチャンバプレートおよび粒子判別方法
ならびに粒子処理装置および細胞処理装置

2. 特許請求の範囲

1. 内部に一对の電極を有した複数の隔壁と該隔壁間に独立に前記一对の隔壁間に電圧を印加する手段とを有することを特徴とするマイクロチャンバプレート。

2. 請求項1記載のマイクロチャンバプレートにおいて、上記一对の電極間に電気抵抗や静電容量や蓄積を検知する手段を付加してなることを特徴とするマイクロチャンバプレート。

3. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートを用いて検出された上記一对の電極間に電気抵抗や静電容量や電荷から、上記隔壁内の粒子の有無または形状を特定することを特徴とする粒子判別方法。

4. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートに、上記一对の電極間に粒子を位置決める手段を

付加してなることを特徴とする粒子処理装置。

5. 請求項4記載の粒子処理装置において、上記粒子を細胞としたことを特徴とする細胞処理装置。

6. 請求項5記載のマイクロチャンバプレートに、上記一对の電極間に位置決めされた細胞融合手段と付加してなることを特徴とする細胞融合装置。

7. 請求項6記載の細胞融合装置を用いて融合し培養したことを特徴とする細胞。

8. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートに、上記隔壁室内に存在する細胞に微小孔を開ける手段を付加してなることを特徴とする細胞への遺伝子導入装置。

9. 請求項8記載の細胞への遺伝子導入装置において、上記微小孔を開ける手段としてレーザ光線を用いることを特徴とする細胞への遺伝子導入装置。

10. 請求項8記載の細胞への遺伝子導入装置において、上記微小孔を開ける手段としてX線を用

特開平2-131569 (2)

いることを特徴とする遮伝子導入装置。

11.請求項5記載の細胞処理装置における細胞を血球とし、該血球の活性度や変形能を判別する手段を付加してなることを特徴とする血球処理装置。

3.発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は細胞融合装置に係わり、特に異種の細胞を1対1に融合させるのに好適な細胞融合のためのマイクロチャンバプレートおよび粒子噴射方法ならびに粒子処理装置および細胞処理装置に関するもの。

(従来の技術)

従来の装置は文献(昭和62年度精工学会春季大会学術講演会論文集p.845~846)に記載のように格子状に配列した隔壁に異種細胞を1対ずつ供給して、吸引ノズルで隔壁の小さな開口部に吸引固定して、同一融合条件で一括して融合を行っていた。

(発明が解決しようとする課題)

いる電極間の電位として測定することにより、粒子や細胞を判別することを可能とした。また、粒子や細胞を挟んだ電極間に電圧を印加することにより個々に吸引又は融合を可能とする装置や細胞融合装置を得た。

(作用)

マイクロチャンバプレート上の隔壁に設けた一对の電極は電圧を印加することにより、電極間に存在する一对の細胞を互いに接触させたり、互いに接触した細胞膜を介して融合したり、さらには、電極間の電位の変化から融合した細胞の形状の変化を知り、融合のパルス電圧を強めたり、弱めたり調整することができる。隔壁を多数、格子上に配列したマイクロチャンバ上で、隔壁からの電極を独立な構造にすることにより、それぞれの隔壁に存在する、細胞の個体差に依存する電気融合条件を微妙に制御することができる。さらに、それぞれの隔壁に存在する細胞の状態を独立に把握できるため、努力を要する目視観察等の手

上記従来技術では、多量の細胞の融合を一括して行うため、大きさや細胞膜の厚さや活性度のばらつき等の個体差のある細胞を全て確実に融合させることが困難であり、未融合細胞と融合細胞とを選別するための労力を必要とする問題があった。本発明の目的は、個体差の大きい細胞の状態をそれぞれ独立に把握し、最適な条件で融合条件を与え、多量の細胞を確実に融合することにあり、さらに独立に状態を把握した細胞に遮伝子を導入することにあり、また、さらに、血痕を用いてその形状等の情報から、細胞の状態を把握するなど個々の細胞を個々に処理することを可能とすることにある。

(課題を解決するための手段)

上記目的を達成するために、それぞれの隔壁に独立な電極を設けて、各電極に独立に電圧等を印加したり、電極間の抵抗等を測定可能な構造の、粒子や細胞を位置決め保持するための多数の隔壁を有するマイクロチャンバプレートを用いた。また、隔壁内の粒子や細胞の運動をそれらを挟んで

段なしに、隔壁の配置場所を把握して抽出することが可能となるので、隔壁の細胞のみを確実に、しかも効率良く生成することが可能となる。また、隔壁に存在する細胞の挙動を把握しながら、レーザ光線やX線を用いて細胞に加工を施せるので遮伝子導入等の細胞処理を容易にかつ確実に行える。さらに、液体中で、細胞等を位置決めするマイクロチャンバの隔壁に、細胞を位置決め保持する際に障害となる気泡の付着の有無を判定できるので、気泡の事前除去が可能となり、細胞等の微小な粒子を信頼性の高く取扱えるマイクロチャンバを提供することができる。

(実施例)

以下、本発明の一実施例を第1図~第3図により説明する。第1図は本発明のマイクロチャンバプレート、第2図はマイクロチャンバプレートを用いた細胞融合装置、第3図はマイクロチャンバプレートの電極の配設パターン例である。第1図~第3図において、共通部分の番号は同一とした。

粒子として、大きさが20~100μmの細胞

特開平2-131569 (3)

を取扱う場合のマイクロチャンバプレートの拡大した断面の鳥瞰図を第1図に示す。マイクロチャンバプレート901は、厚さ400μmのシリコンエラストomerに異方性エッチング処理によりピッチ770μmの格子状の配列で形成された隔壁101～103、201～203を有している。隔壁101～103には一対の細胞を電気的に融合するため、異種細胞が2個ずつ吸引保持されている。なお、隔壁201～203には細胞が入っていない状態を示してある。全ての隔壁には、隔壁103の吸引孔603と同一の構造の吸引孔が形成されている。吸引孔の下側より回示していない吸引手段を用いて吸引することにより、細胞を位置決め保持できる構造となっている。これらの細胞は、図示していない容器(第2図906)に誘導された等価液中で、図示していない搬送手段(第2図902、903)によりそれぞれの隔壁に所定の数だけ移し替える。隔壁103には一組みの電極802、803が形成され、配線101、103を経て図示していない制御系(第2図

905)につながっている。他の隔壁101、102、201～203からも、それぞれ互いに独立に電圧を加えたり、電位を測定できるように電極と配線11、12および20～23が制御系に接続している。

第2図は第1図に示したマイクロチャンバプレート901を用いた細胞融合装置904の外観図である。浸透圧を殺して細胞の活性を保つため、等張液として0.5molのソルビトール液を容器906の中に入れる。異種細胞をA、Bとすると、細胞Aを搬送する手段902、細胞Bを搬送する手段903を有している。搬送手段は、マイクロチャンバプレート901の隔壁に細胞AとBをそれぞれ1個ずつ移し替えるため、それぞれ隔壁に對応した位置に細胞をそれぞれ1個だけ吸引する吸引手段を有した構造となっている。搬送手段902、903はそれぞれx、z軸方向に移動でき、マイクロチャンバプレートの隔壁に細胞を移し替えることにより、一対の細胞A、Bが位置決め保持される。各隔壁に独立に設けられた電極か

らの配線は制御系905に接続されている。制御系905は、マイクロチャンバプレートの隔壁内の細胞を電気的に融合させるための電源や、細胞の状態を細胞を挟んだ電極間の位置変化として把握して、細胞の状態に応じて印加電圧を調節したり離脱する等の処理を行う処理回路、搬送手段902、903を駆動してマイクロチャンバプレートに細胞を移し替える操作等を制御する回路等から構成されている。

第3図はマイクロチャンバプレートの隔壁にそれぞれ独立に設けられた電極101～104、201～204、301～304、401～404と、これらの電極からの配線101～14、201～24、301～34、401～44を平面状にパターン化した例である。

次に第1図に隔壁103内の細胞を例にして、電気的な細胞融合の過程を述べる。搬送手段により移し替えられ、位置決めされた細胞800、801は吸引孔603からの吸引圧によって、吸引孔直上で互いに接触する。一対の細胞は電極間

に長手方向を成した吸引孔603によって、互いに接触しBの字状を成し、その長手方向が電界方向と一致するように位置決めされる。接触を保った状態で、電極間にパルス状の電圧を印加すると、電極に挟まれた一対の細胞が接触した細胞膜の部分から融合し始める。融合の進行に伴って接触していた細胞は、だるま状から指円体状を経て球状体となる。一組みの電極間の抵抗や許電容量や電荷量は、細胞の形状変化に伴って変わること。

半径 r_1 、 r_2 の細胞が融合して半径 r の大きさに変化するものと仮定すると、細胞の電容積が一定であるので、次式が成立する。

$$r_1^2 + r_2^2 = r^2$$

接触した細胞の最大長は

$$2 \cdot (r_1 + r_2)$$

で、融合後の細胞の最大径は

$$2 \cdot r = 2 \cdot (r_1 + r_2)^{1/2}$$

である。例えば、等しい半径 R の 2 個の細胞が接触している時の最大距離は $4R$ である。融合後の球体の半径は $(2)^{1/2} \cdot R = 1.26 \cdot R$ となり、最大距離は $2.52 \cdot R$ と 2 個の細胞が接触していた時に比べて 63% と小さくなる。従って、電極間の電位変化として検出できる。

融合のためパルス状の電圧を印加した後、電極間の電位変化が始まれば、その時細胞融合が始まることになる。細胞融合が進行して一つの球体となると、電極間の電位変化が小さくなる。従って、一对の細胞で融合用のパルス状電圧を印加した直後に、電極間の電位を測定し、その変化率を求めることにより、融合の開始点を把握することができる。細胞融合が始まるまでは、適当な時間でパルス状電圧を加え続け、さらに、融合が始まらない時には印加するパルス状電圧を漸次昇圧して印加条件を変えることにより、細胞を融合させることができる。電位変化が現われて融合の開始点が検出された後には、融合を遅延させるためにパルス状電圧の印加を停止する。また、細胞の活性

が弱い場合等には、パルス状電圧の印加により細胞が破壊することがあるが、この時の電位変化のモードは急峻な変化の後に一定となるモードを示す。従って、融合の進展に伴なって現われる緩やかな電位変化のモードと区別することができる。また、細胞の損傷点を把握することができる。

隔壁内で 1 個の細胞の破壊が判明した場合には、残りの細胞が未融合のまま残って、隔壁時に停滞することが防ぐために、残りの細胞を破壊処理させたための高い電圧を印加する。残存細胞の有無や増殖状況も電位変化から検知できる。以上の方針により、隔壁の融合率を 200 nm とし、0.5 mol のソルビトール液を用いて、サラダ葉の細胞を融合させる場合には、約 2.5 V、
 $1.50 \mu s$ のパルス状電圧を 1~数回繰り返すだけで細胞融合が始まり、8 の字状の接触状態から、だるま状、椎円体状を経て、約 2~3 分で球体状に融合が進む。

第 1 図 第 3 回における電極からの配線パターン

は互いに交差しないので、バーニングは簡単であるが、チャンバプレート上に形成可能な隔壁の数に限度がある。第 4 図は配線パターンを立体的に交差する構造にすることによって、隔壁の数に制限なしにチャンバプレート上に形成可能な場合の一実施例である。 y 方向の配線 10、60 と x 方向の配線 1~7 の交差点に対応して一組みの電極 1~6 がバーニングされている。それぞれの電極に電圧を印加したり、電極間の電位を測定するための接続方法は、公知の 2 次元被覆ダイバイスや 2 次元 MOS イメージセンサ等を駆動する方法の応用で可能である。

第 5 図は第 4 図に示した配線方法を用いた S1 層のマイクロチャンバプレートを拡大した断面の鳥瞰図である。細胞を吸引位置決めする吸引孔（寸法 $1.0 \mu m \times 8.0 \mu m$ ）を有する細胞保持溝プレート 200 と、吸引孔の位置に対応して隔壁を構成している隔壁プレート 201 との二枚重ね構造である。重ね合わせる部分に形成した電極頭を示すため、細胞保持溝プレートと隔壁プレート

とを分離した状態を示してある。A u 製の厚さ 300 nm の配線 6、7 および 10~30 は、第 4 図の配線パターンと同一番号の部分に対応する。交差する配線の交差部分は S1O_x 製の地盤層で遮断的に行き渡されている。次に、隔壁 37 を用いて説明する。隔壁 37 の吸引孔 300 の長手方向に配線 6 からの電極 301 と配線 30 からの電極 302 が形成されている。吸引孔 300 の横方向には S1O_x 製の絶縁体の凸部 303、304 が形成されている。絶縁体の凸部 303、304 は吸引孔を挟んで配置されており、電極 301 と 302 との間に電圧を印加した時に生じる電気力線を吸引孔の中央で収束させる構造がある。従って、吸引孔上に接触位置決めされた一对の電極に對して効率の良い電圧印加や測定を可能としている。

次に、一对の電極間に存在する細胞の状態や活動を遮断的に検出した実施例を第 6~8 図を用いて述べる。第 6 図は、本発明の実施例の電極部擴大図で、電極 601、602 との間に溝線相

特開平2-131569 (5)

603, 604が互いに接触し位置決めされている状態を示している。これらの構造や相違は等強度605に従っている。文献(総合工学Vol.3, No.6, 1988, p.497-505のp.500, p.502)に示されているように、0.5molのソルビトールの等張液の抵抗値は約1kΩ・mで、細胞膜の抵抗値は約1000kΩ・mである。通常、細胞膜の厚さは約10nmであるのでその厚さ方向の抵抗は約1kΩである。本発明の電極601と602の間隔は2000μmで、その抵抗は約0.2kΩである。従って、対向する電極の端を細胞の直径より小さくするか、純粋体(第5図の303, 304に相当)を設けて電界が細胞に集中する構造にすることによって、電極間に存在する細胞の形状に存在する抵抗を測定することが可能である。電極601と602間に電源606から定電圧をパルス状に印加して、検出回路607から細胞の膜の厚さに存在する抵抗を求め表示していない制御系(第2回905に相当)に出力する。なお、低電圧をパルス状に

印加するのは等張液の電気分解を防ぐためである。測定処理後に得られる細胞の形状に存在する抵抗値の時間的変化の例として第7, 8図に示す。第7図は融合過程の抵抗特性を示す。また第8図は細胞の破壊過程を示す。両図とも横軸は時間t₁、縦軸は抵抗値r₁を表わしている。

第7図において、細胞が電極間に存在しない時間t₂には等張液のみの抵抗値r₂(約0.2kΩ)、細胞が1箇だけ位置決めされている時間t₃には細胞1個分の膜厚に依存した抵抗値r₃(約2kΩ)、細胞が2箇だけ位置決めされている時間t₄には細胞2個分の膜厚に依存した抵抗値r₄(約4kΩ)、細胞融合が始まり細胞の融合が進行している時間t₅には、互いに接触していた部位の膜が薄くなり融合が進むに連れて抵抗値が減少し、r₅となり、その結果、複数細胞が形成される。時間t₆には複数細胞として存在している時の抵抗値r₆を示す。

第8図は細胞の数と破壊の有無を示す特性の一例である。時間t₁~t₂までは第7図と同じであ

る。2箇存在していた細胞のうち1箇が破壊すると時間t₁とt₂との間の変化のように抵抗値の変化は急激となる。従って、細胞融合が進行中の膜やかな抵抗値の変化(第7図t₅に相当)と比べて区別して処理することが可能である。時間t₃の抵抗値r₃(ほぼr₂に等しい)は一対の細胞のうち1箇だけ破壊して、残り1箇となった時の初期の抵抗値である。さらに、残りの1箇の細胞も破壊すると、時間t₄に示すような抵抗値r₄(ほぼr₃に等しい)となる。なお、それぞれの物質の抵抗値は細胞の形状や等張液の濃度、電極質の濃度、細胞の種類等により左右されることは明らかであるが、一度条件を求めれば、大きなばらつきはない。また、静電容量や誘電率などの電気的特性も検出回路の応用として考えることは容易である。

以上述べた実施例は、20~100μmの細胞を取扱う場合であるが、この寸法以外の細胞や粒子に対しても、マイクロチャンバプレートの隔壁や吸引孔を適切に設計することにより容易に応用

できることは明らかである。なお、吸引孔のμmオーダーの加工は半導体プロセスで用いられているパターンング技術やエッチング技術を応用することで実現できる。また、マイクロチャンバプレートの材料等は加工寸法や精度に応じて、Si以外の硝子や樹脂やセラミクス等を用いることも可能である。

さらに、本発明で示した細胞融合装置以外に、所定濃度の細胞を隔壁に入れてその状態を把握しながら薬品処理を行ったり、培養処理を行う等の細胞処理装置として用いることも可能である。

また、所定の遺伝子を界離した液の中に細胞の位置決めされたマイクロチャンバプレートを入れ、細く絞ったレーザ光線やX線を細胞壁に照射して吸引孔を開け、遺伝子を細胞内にれる遺伝子導入装置として用いることも可能である。

さらに、粒子として血球を用いれば、隔壁に位置決めされる血球の数を計数することにより、単位表面あたりの血球の数を計測して、血球濃度を求めることができる。また、隔壁に位置決めした

特開平2-131563 (6)

血球に電圧を印加して、その電圧による形状の変形具合から、血球の変形能を求めて診断に供することのできる血球処理装置として用いることも可能である。

なお、粒子を液体中に位置決めして扱うマイクロチャンバプレートにとって、隔壁や吸引孔に気泡が付着することは粒子を操作する上で好ましくない。それぞれの隔壁の電極間の電位を予め測定することにより気泡の有無を検知し、気泡を除去したり、データ処理上の配慮をすることが可能となるので、信頼性の極めて高いマイクロチャンバを提供することができる。

〔発明の効果〕

本発明によれば、細胞や粒子の状態を個々に、独立に把握することができるので、従来、細胞の個体差が大きいため人手に頼らざるを得ず自動化することが困難であった細胞融合を、自動的に大量に行えるシステムとすることが可能となったので、細胞工学の大きな発展に寄与できる。また、マイクロチャンバプレート上の隔壁の配列は既知

であるので、隔壁内の粒子や、細胞を希地付け管理することができ、細胞の処理を施した後の粒子や、細胞の挙動を個々にコンピュータに取り込み処理するなどして、従来、不可能とされていた細胞や遺伝子工学上の過剰研究等に貢献できる。

4. 図面の簡単な説明

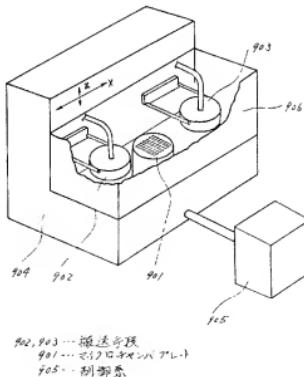
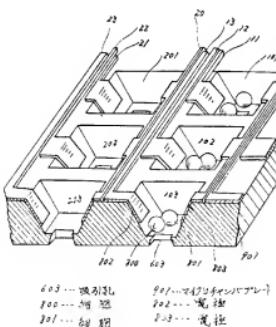
第1図は木暮明の第1の実施例の拡大断面の鳥瞰図、第2図は第1の実施例の装置の外観図、第3図は第1の実施例の配線パターン図、第4図は第2の実施例の配線パターン図、第5図は第2の実施例の拡大断面の鳥瞰図、第6図は木暮明の実施例の電極部拡大図、第7図は融合過程の抵抗特性を示す図、第8図は制御過程を示す図である。

符号の説明

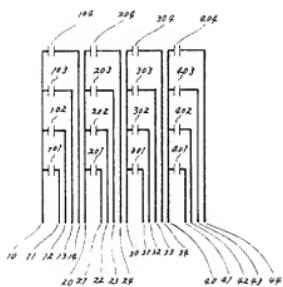
1 0 ~ 2 1 … 配線、 1 0 1 ~ 2 0 3 … 隔壁、
6 0 3 … 吸引孔、 8 0 0, 8 0 1 … 細胞、
8 0 2, 8 0 3 … 電極、 9 0 1 … マイクロチャンバプレート

第2回

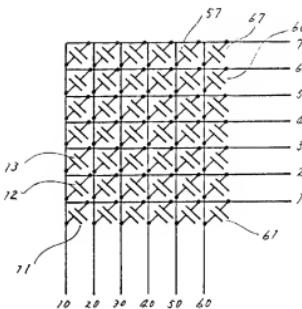
第1回



第3圖

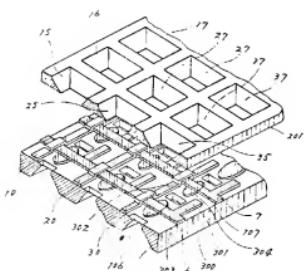


第4回



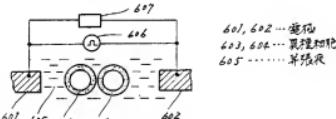
10, 20, 30, 40, 50, 60, --- Y 方向の配列
 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, --- X 方向の配列
 1, 12, 13, 57, 61, 66, 67, --- 一組の座標

三五

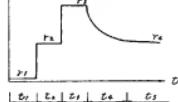


200... 検視洗浄清潔アート
201... 検査アート
6,7... 配達
10,20,30... 配達
15,16,17,18... 勝利
23,24...
30... 組織アート
301,302... 豊松
303,304... 森林体感アート

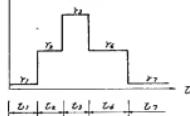
第六圖



第7回



第8回



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号
C 12 N 5/10 7329-4B
13/00
15/02
G 01 N 33/48 M 7055-2G

⑥発明者 小比田 啓之 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内